

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК
ПРОТОКОЛОМ "ЦТАБ-RVP-МЕРКАПТОЭТАНОЛ" ИЗ РАЗНЫХ
ОРГАНОВ (ПОЧКА, ЛИСТ, СТЕБЕЛЬ) РАСТЕНИЙ**

А.М. Бриштен, И.В. Василевич, 3 курс

*Научный руководитель – Н.В. Водчиц, зав. отраслевой лабораторией
"ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве"*

Полесский государственный университет

Введение. Одна из основных проблем при выделении тотальной ДНК – наличие в клетках древесных и кустарниковых растений эндогенных полисахаридов и фенольных соединений, которые трудно отделить от нуклеиновых кислот [5, с. 252]. Накапливаясь в определенных частях растений, они оказывают существенное негативное влияние на процедуры изолирования и последующего использования ДНК [3, с. 12].

Для экстракции ДНК обычно используют молодые зеленые листья растений [2, с. 35], так как в них содержится небольшое количество запасных веществ и вторичных метаболитов. Тем не менее, накопление их в различных частях и органах тесно связано с жизнедеятельностью культур и фазой их развития [4, с. 149]. Следовательно, из одних органов растений можно выделить большее количество ДНК с лучшей степенью очистки, по сравнению с другими органами.

Цель данной работы – дать сравнительную характеристику выделенной ДНК протоколом "ЦТАБ-RVP-меркаптоэтанол" из разных органов растений (почка, лист, стебель).

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены на базе отраслевой лаборатории "ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве" биотехнологического факультета учреждения образования "Полесский государственный университет" (далее ОЛ ДНК и КТР и ЖБТФ ПолесГУ). В качестве объектов использовали ткани разных органов растений (лист, стебель и почка), сортов произведённых методом клонального микроразмножения *in vitro* голубики высокорослой "Элизабет", "Хардиблю", "Патриот", "Блюкроп", "БриджиттаБлю", сирени обыкновенной "Нестерка" и "Абель", прошедших адаптацию и доращивание до двухлетнего возраста на базе тепличного комплекса, полученных от ЦБС НАН Беларуси, и адаптантов голубики высокорослой "Аврора", "Бонус", "Патриот", "Спартан", "Блюголд", "Блюджей", "Бриджита", "Элизабет", "Нельсон", "Хардиблю", полученных на базе ОЛ ДНК и КТР ЖБТФ ПолесГУ.

Выделение ДНК проводили с помощью протокола "ЦТАБ-RVP-меркаптоэтанол" [1, с. 26]. Оценку эффективности выделения нуклеиновых кислот из листьев, стеблей и почек растений проводили, используя электрофоретическое разделение полученного продукта в агарозном геле, а также спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты образцов.

Измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике по объёму 1,0 мкл полученного экстракта в 1-3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220-350 нм.

Длину фрагментов выделенной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза экстракта с загрузочным красителем, наносимых в 0,8% агарозный гель, в трис-боратном буфере, при напряжении 80-100 В, в течение 30 мин. Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4.

Результаты и их обсуждение. Спектрофотометрический анализ ДНК, полученной протоколом «ЦТАБ-RVP-меркаптоэтанол» показал, что соотношение поглощения при 260/280 нм, в среднем, у образцов ДНК голубики равно 1,93, у образцов ДНК сирени – 2,09 (Таблица).

Таблица 1. – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК голубики высокорослой и сирени обыкновенной

№ образца	Сорт голубики	Концентрация ДНК, нг/мкл	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$
1.	«Аврора» (стебель)	50,0	1,89
2.	«Аврора» (стебель)	86,4	1,97
3.	«Блюголд» (стебель)	62,9	1,84
4.	«Блюджей» (стебель)	64,7	1,91
5.	«Блюкроп» (лист)	119,3	2,04
6.	«Блюкроп» (стебель)	61,4	1,95
7.	«Бонус» (стебель)	42,4	1,91
8.	«Бонус» (стебель)	53,1	1,79
9.	«Бриджита» (стебель)	42,6	1,81
10.	«Бриджита» (стебель)	56,9	1,86
11.	«БриджиттаБлю» (лист)	259,6	2,02
12.	«Нельсон» (стебель)	54,7	1,98
13.	«Патриот» (лист)	323,0	2,06
14.	«Патриот» (стебель)	34,2	1,85
15.	«Спартан» (стебель)	54,2	1,92
16.	«Хардиблю» (почка)	373,7	2,04
17.	«Хардиблю» (стебель)	30,1	2,02
18.	«Элизабет» (почка)	199,0	2,05
19.	«Элизабет» (стебель)	24,1	1,68

20.	«Элизабет» (стебель)	39,8	1,96
Среднее:		101,61	1,93
№ образца	Сорт сирени	Концентрация ДНК, нг/мкл	$\lambda 260 / \lambda 280$
1.	«Абель» (лист)	628,4	2,21
2.	«Абель» (почка)	468,1	2,10
3.	«Абель» (стебель)	61,5	1,97
4.	«Нестерка» (почки)	274,7	2,06
Среднее:		358,18	2,09

Наибольшая концентрация ДНК из органов голубики равна: лист – 323,0 нг/мкл, почки – 373,7 нг/мкл, стебель – 86,4 нг/мкл; из органов сирени: лист – 628,4 нг/мкл, почки – 468,1 нг/мкл, стебель – 61,5 нг/мкл. Средняя концентрация ДНК из листьев голубики равна 234,0 нг/мкл, из почек – 286,4 нг/мкл, из стебля – 50,5 нг/мкл; из листьев сирени – 628,4 нг/мкл, из почек – 371,4 нг/мкл, из стебля – 61,5 нг/мкл. Стоит отметить, что были взяты стебли адаптантов голубики, и их масса была значительно меньше по сравнению с массой почек и листьев.

В целом нам удалось получить ДНК с хорошей концентрацией и очисткой. В дальнейшем для получения нуклеиновых кислот можно использовать разные органы голубики высокорослой и сирени обыкновенной, предпочтительней молодые почки и листья. Однако подобные образцы по ряду причин далеко не всегда доступны, поэтому для получения удовлетворительных результатов можно использовать стебли из молодых и взрослых растений.

Выводы. Протокол «ЦТАБ-RVP-меркаптоэтанол» для изоляции ДНК позволяет использовать листья, стебли и почки разных культур. Он достаточно воспроизводимый, не требует больших затрат времени с хорошей очисткой выделяемой нуклеиновой кислоты.

Список использованных источников

1. Водчиц, Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2014. – № 2. – С. 25–30.
2. Кутлунина, Н. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие / Н. А. Кутлунина, А. А. Ермошин ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.
3. Рябушкина, Н. А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н. А. Рябушкина [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 9–26.
4. Сажина, Н. Н. Измерение суммарного содержания фенольных соединений в различных частях лекарственных растений / Н. Н. Сажина, В. М. Мисин // Химия растит. сырья. – 2011. – № 3. – С. 149–152.
5. Решетников, В. Н. Обогащение, сохранение и изучение генофонда сирени в ЦБС НАН Беларуси / В. Н. Решетников [и др.] // Современные направления деятельности ботанических садов и держателей ботанических коллекций по сохранению биоразнообразия растительного мира : материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения акад. Н. В. Смольского, Минск, 27–29 сентября 2005 г. / ЦБС НАН Беларуси ; редкол.: В. Н. Решетников (гл. ред.) [и др.]. – Мн.: Эдит ВВ, 2005. – С. 250–254.